Ueberreicht vom Verfasser.

A 49

Sonderabdruck

aus

Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie

und für

mikroskopische Technik

Teemen

— *Sonderabdruck.* —
Zeitschrift für wissenschaftliche Mikroskopie und für mikroskopische Technik
Band XXII, 1905, p. 539—543.

[Istituto di Anatomia Patologica della R. Università di Padova. Diretto dal Prof. A. Bonome.]

Per la colorazione delle cellule cromofile dell'Hypophysis cerebri.

Nota di tecnica istologica

del

Dr. Giovanni Cagnetto,
aiuto e libero docente.

L'estensione acquistata in questi ultimi tempi dalle ricerche anatomiche e sperimentali sull'hypophysis cerebri ha fatto sentire negli istologi più vivo il bisogno di un metodo facile e rapido, che serva alla dimostrazione di quelle cellule cromofile, sulla cui presenza sembra imperniarsi, per consenso ormai generale, la funzione della parte glandolare di quest'organo tuttora così enigmatico.

Il più semplice degli artifici ancora in uso è quello stesso che ha servito al Flesch,[1] nei suoi vecchi studi sulla glandola pituitaria, per differenziare l'una dall'altra le due varietà fondamentali di cellule del lobo glandolare: le cellule cromofile e le cromofobe. È il metodo molto elementare e comodo della colorazione del tessuto con l'ematossilina-eosina.

Col perfezionarsi della tecnica microscopica altri metodi più delicati e più spiccatamente specifici entrarono nell'uso comune degli istologi. In Italia, ad es., ebbero larga applicazione e buona fortuna quelli del Vassale[2] e del Galeotti[3]; in Germania particolarmente il metodo di Benda[4], il quale del resto ha trovata anche nel nostro paese tutt'affatto recentemente la migliore accoglienza.

---

1) Flesch, Tageblatt der 57. Versammlung deutscher Naturforscher und Ärzte in Magdeburg, 1884.

2) Vassale, Rivista sperimentale di Freniatria, 1901, Fasc. 3—4, p. 1078.

3) Galeotti, Arch. f. mikrosk. Anatomie Bd. XLVIII, 1896, p. 305.

4) Benda, Neurologisches Zentralblatt, 1900, p. 786.

Impegnato da qualche tempo in alcune ricerche sistematiche di fina anatomia sul lobo glandolare della pituitaria nello stato normale e patologico, ho cercato apportare ai metodi tecnici ora in uso modificazione tale, che conciliasse in essi l'economia dei reagenti con la celerità del procedimento di colorazione. Di questa desiderata semplificazione di metodo ho avuto modo di valutare particolarmente i vantaggi in quei casi nei quali gli artifici di colorazione universalmente adottati non rispondevano perfettamente allo scopo o in quelli altri nei quali mi premeva il bisogno di un ragguaglio sollecito e sicuro intorno allo stato di maggiore o minore attività funzionale del tessuto glandolare dell'ipofisi su preparati in serie. Siccome penso che molti di coloro che si occupano al dì d'oggi di questioni attinenti l'istologia della glandola pituitaria si sieno già trovati o possano trovarsi, nel corso delle loro indagini, in circostanze analoghe alle mie, non credo del tutto superfluo il dedicare poche parole all'esposizione del metodo ch'io da qualche tempo seguo nelle mie ricerche.

Io soglio fissare una metà dell'ipofisi umana in soluzione di formolo commerciale al 10 % per 3—4 giorni, rinnovando il liquido dopo le prime 24 ore ed anche prima, se si è fatto rossigno. Il pezzo tolto dal formolo e lavato in acqua corrente per qualche minuto, viene tosto immerso in una soluzione acquosa diluita di acido cromico al 0,1 % per due giorni e in nuova soluzione cromica al 0,25 % per altri due giorni, possibilmente esponendo il liquido, durante questo tempo, in termostato alla temperatura di 37°. La formula di fissazione non varia dal metodo già ricordato del Benda, se non per quanto riguarda la titolazione della soluzione cromica, ch'io credo eccessiva se portata al 0,50 %, come il Benda prescrive. L'acido cromico molto diluito penetra più profondamente nel tessuto, poichè non determina, alla superficie del pezzo, la formazione di quella crosticina coriacea, impermeabile, che inevitabilmente si costituisce allorquando il titolo della soluzione cromica è un po'alto: in tal caso è facile infatti constatare che l'impregnazione del pezzo si limita al solo strato più superficiale, senza raggiungere le parti profonde. Al contrario, con l'acido cromico diluito si ottiene in ogni caso una uniforme e completa impregnazione del tessuto anche se il pezzo è discretamente voluminoso (2—3 cm quadrati di larghezza per 3—4 mm di spessore).

Dopo la cromizzazione il pezzo va lavato in acqua fino a che non ceda quasi più acido cromico (30—40 ore), ed in seguito

vien passato attraverso alla serie degli alcool fino a disidratazione, chiarificato in xilolo ed incluso in paraffina.

A tal punto l'ipofisi sarebbe pronta per applicarvi la colorazione del Benda all'alizarinato di soda e bleu di toluidina: però io preferisco procedere diversamente.

Le sezioni microtomiche sottili, attaccate al portaoggetti con albume glicerinato molto diluito (goccie 2 in un ditale d'acqua), son colorite per 5′—10′ con una soluzione satura acquoso-anilinata di fuxina acida e riscaldate nel frattempo cautamente alla fiamma di una lampada a spirito finchè si sollevano i primi vapori. Quando il portaoggetti è freddo, si toglie la fuxina con un filo d'acqua e si differenzia per 4′—5′ mediante una soluzione acquosa, satura a freddo, di acido picrico. È opportuno, durante il differenziamento, impartire al portaoggetti leggieri movimenti di oscillazione laterale così da agevolare la decolorazione della sezione, procurando che essa rimanga bagnata costantemente da soluzione picrica fresca. Disponendo di sezioni un po' spesse è utile procedere al differenziamento sotto l'azione di un temperato calore, tenendo il preparato, ad es., sopra una lampada Bunsen ad una certa altezza dalla fiamma: lo stesso risultato con un po' di pazienza, impiegando qualche minuto di più, lo si ottiene del resto anche col differenziamento a freddo. Allorquando la sezione ha acquistato un color rosso-mattone leggermente tendente al gialliccio, si toglie la soluzione picrica sotto il filo d'acqua e si vede tosto, durante il lavaggio, il color rosso-mattone trasformarsi in rosso chiaro. È questa la tinta confaciente: qualora il preparato dopo il lavaggio risultasse colorito ancora troppo intensamente, converrebbe prolungare il differenziamento fino ad ottenere la tinta voluta.

In seguito si disidrata rapidamente con alcool assoluto, asciugando la sezione con carta bibula, si rischiara con lo xilolo e si monta in balsamo.

Io sento di poter affermare con tutta sicurezza che l'applicazione del metodo di colorazione suesposto all'ipofisi fissata in formolo-acido cromico rappresenta, per il rilievo delle cellule cromofile, un procedimento meno infido sia del metodo originale del Benda che di quello stesso del Galeotti, ch' è così prezioso per altri dettagli citologici dell'ipofisi. A me, ripeto, è accaduto spesso di veder colorite distintamente le cellule cromofile di ipofisi, nelle quali i suindicati metodi mi avevan dato risultato incerto e preparazioni di complesso poco dimostrative.

Il procedimento da me adottato, oltre che avere il doppio pregio

dell'economia nel fissatore e della rapidità nella colorazione, ha sugli altri due sopradetti una decisa superiorità: quella di dare *a colpo d'occhio* all'osservatore una sicura nozione del numero delle cellule cromofile esistenti in una data sezione di ipofisi. Con esso si colorano, infatti, specificamente in rosso-vivo brillante le sole cellule cromofile: le cellule pallide, prive di granulazioni protoplasmatiche, prendono una tinta caffè-latte, il connettivo una tinta rosa, come nel metodo di v. Gieson, e le emazie un colore aranciato cupo. La constatazione della quantità, sia pur approssimativa, degli epiteli granulosi presenti in un preparato di ipofisi riesce perciò oltremodo facile, impiegando a tal uopo un obbiettivo di media potenza, come, ad es., il No. 5 Koristka o anche un obbiettivo di minor forza.

Questo trattamento ha eziandio il vantaggio di dare buoni risultati anche nelle mani di un tecnicista poco esperto: esso riduce il metodo di colorazione delle cellule cromofile ad una pratica assolutamente elementare, evitando le lungaggini e le difficoltà del metodo di Benda, che abbisogna di una certa maturità nel preparatore, e quelle non sempre facilmente superabili del metodo originale del Galeotti alla fuxina e verde di metile.

Riassumo qui in forma cronologica e sintetica il procedimento.

1⁰ Fissazione di una metà dell'ipofisi in formolo commerciale al 10% per 3—4 giorni.

2⁰ Passaggio in soluzione cromica al 0,10 % per due giorni ed al 0,25 % per altri due giorni.

3⁰ Lavaggio prolungato in acqua.

4⁰ Serie degli alcool fino a disidratazione.

5⁰ Xilolo.

6⁰ Paraffinazione.

7⁰ Trattamento delle sezioni sparaffinate, a caldo, per 5′—10′ con soluzione acquoso-anilinata satura di fuxina acida. Si prepara il liquido in questo modo. Si sciolgono a caldo (70⁰—80⁰) in una capsula di porcellana, cc 3 di olio di anilina in cc 100 di acqua distillata e, lasciata raffreddare la soluzione, la si versa a poco a poco in un mortaio contenente gr 2 di fuxina acida finemente polverizzata. Si adopera la miscela colorante dopo 24 ore, previa filtrazione.

8⁰ Lavaggio in acqua corrente.

9° Differenziamento per 4′—5′ con una soluzione acquosa satura a freddo di acido picrico.

10° Nuovo lavaggio in acqua corrente.

11° Rapida disidratazione in alcool assoluto; xilolo e balsamo del Canadà.

Il metodo si presta bene anche pel rilievo, nella tiroide, delle cosidette Kolloidzellen di Langendorff ed inoltre per lo studio delle isole di Langerhans del pancreas, le quali spiccano sul resto del tessuto per un bel color rosso-vivo, al pari dei nidi di cellule cromofile dell' ipofisi.

[Eingegangen am 30. Dezember 1905.]
